

**Válasz Prof. Dr Vékey Károlynak, a MTA doktorának
a „Korszerű analitikai módszerek alkalmazása a peptid és
fehérjekutatásban” c.,
a MTA doktori értekezéséről írt bírálatára**

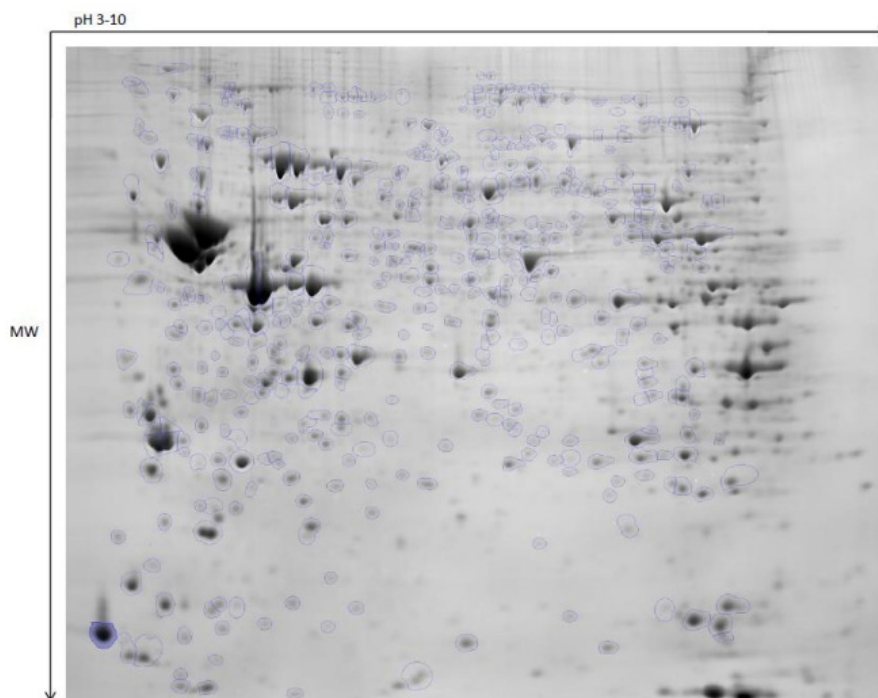
Köszönöm Prof. Dr. Vékey Károlynak, hogy nagy gonddal átolvasta és véleményezte értekezésemet, ami valóban nem egy kutatási téma, hanem az elmúlt 20 év eredményeinek összefoglalása. A saját intézetünkben végzett kutatásokon túlmenően a bemutatott eredmények jelentős része peptidkémikusokkal, biológusokkal, biokémikusokkal, gyógyszerészekkel, élelmiszerkutatókkal való együttműködésből származik, amelyekhez mi a rendelkezésünkre álló, ill. általunk fejlesztett eszközökkel, módszerekkel járultunk hozzá. A kísérleteket rendszerint közös megbeszéléseket követően végeztük el, így az analitika nem kiszolgáló, hanem együttes alkotó tevékenységgé vált.

Örülök, hogy a bíráló érdekesnek és nemzetközileg is kiemelkedő jelentőségűeknek találta az utóbbi években a proteomikai vizsgálatok ismételhetőségének, megbízhatóságának, ill. a gélelektroforézissel elválasztott fehérjék relatív és abszolút mennyiségeinek meghatározására kidolgozott módszereinket. Ez utóbbit az előadás során már bemutattam és mivel a bíráló mind a két kérdése az első témakörhöz kapcsolódik, ezért egy kicsit részletezem azt és válaszolok a kérdésekre.

A biológiai, élettani, orvosi és farmakológiai kutatások végeredményének minőségét elsősorban két tényező: a választott állatmodell tulajdonságai (biológiai változatosság) és a kísérlet kivitelezésének minősége (technikai ismételhetőség) határozzák meg. Felmerült tudományos kérdések állatkísérletes megválaszolásában alapvető szerepe van a megfelelő állatmodell kiválasztásának, ill. annak, hogy a kísérleti állatok genetikai jellemzői megfeleljenek a kísérlet célkitűzéseinek. Genetikai tényezők határozzák meg az állatok tulajdonságait, beleértve a különböző fizikai hatásokkal, kémiai anyagokkal, kórokozó mikrobákkal és idegen, illetve saját antigénekkal szembeni érzékenységet, ill. a kiváltott reakció mértékét.

Arra voltunk kíváncsiak, hogy állatkísérletekben az állatok egyedisége (biológiai változatosság) hogyan befolyásolja az állatcsoport homogenitását, mert azt már a kísérlet megtervezésekor tudnunk kell, hogy egy-egy kísérleti csoportban mi az a minimális állatszám, ami mellett még értelmes, statisztikailag szignifikáns különbség várható két csoport között. Neurobiológiai kísérletek végzéséhez ismernünk kell, hogy a genetikai tényezők hogyan befolyásolják az agy fehérjeösszetételét. A biológiai változatosság itt a különböző fehérjék

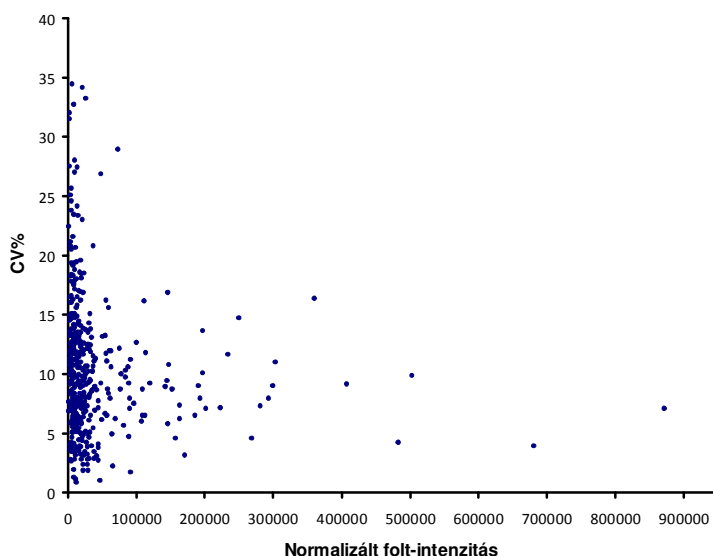
eltérő mennyiségében jelentkezhet. A 2D-poliakrilamid elektroforézis ma is a legszélesebb körben használt proteomikai módszer egy külső vagy belső hatásra bekövetkező fehérjeprofíl globális változásainak kvantitatív meghatározására. A 2D-elektroforézis összetett, munkaigényes, nem automatizált módszer, amely következő lépésekből áll: mintaelőkészítés, izoelektromos fókuszálás, SDS-gélelektroforézis, festés és kiértékelés. Egy reprezentatív gél elektroferogramját mutatja az alábbi ábra.



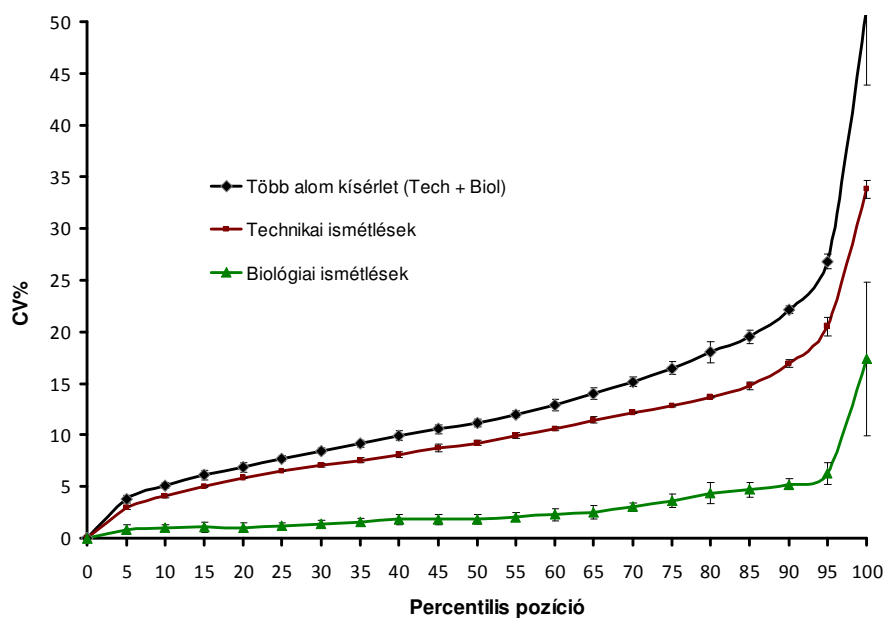
A 2D-elektroforézis eredményeinek megbízhatóságát sok tényező befolyásolja, ami az ún. technikai reprodukálhatósággal (pl. variációs koefficienssel) jellemezhető. Meghatározását ugyanazon, NMRI egérből származó agyminta 4-4 db poliakrilamid gélen történő párhuzamos analízisével végeztük el. A két sorozatban, közel 800 fehérjefolt intenzitásának méréséből számítva a medián CV% 9,3%-nak adódott, valamint a foltok 95%-ának variációs koefficiense 20,5%-nál kisebb. Ez az eredmény jobb, mint más laboratóriumban hasonló poszt-elektroforetikus festett gélek esetében (16,2%), de gyengébb, mint a 2D-DIGE kísérletekben mért 7%.

Azt találtuk, hogy a kisebb mennyiségű fehérjék meghatározása nagyobb hibával jár, azaz a kisebb foltok mennyiségi mérésének nagyobb a variációs koefficiense, mint a nagyobbakénak. Azt nem lehet biztosan állítani, hogy minden esetben ugyanarra a kis intenzitású fehérjére kapjuk a nagyobb szórást, csak az az általános törvényszerűség

érvényesül, hogy minél közelebb vagyunk a kimutatási határhoz, annál nagyobb relatív hibával terheltek a mérések.



A biológiai variabilitás meghatározására kísérletsorozatot terveztünk azonos, ill. külön almokból származó egerekből képzett kísérleti állatcsoportokkal. Az azonos körülmények között elvégzett 2D-elektroforézis kísérletek nyert eredmények variációs koefficiensei 12,1%, ill. 11,2%, tehát 20-30%-kal nagyobb, mint a technikai reprodukálhatóság meghatározásánál kapott értékek. Közvetlenül a biológiai variabilitást nem lehet meghatározni, mert az itt kapott értékek tartalmazzák a 2D-elektroforézis kivitelezésének technikai variabilitását is. Így a két variabilitás összegét, az ún. totál variabilitás összegét határoztuk meg.



A biológiai variabilitást korábban nem számoltuk ki, csak azt mondtuk, hogy az általunk végzett kísérletben a totál variabilitást a technikai ismételhetőség fogja döntően meghatározni.

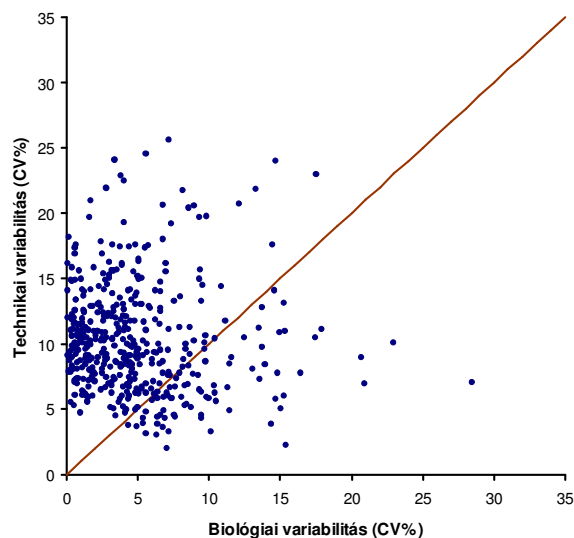
A bíráló kérésére elvégeztem a hibaterjedés vizsgálatát e két, egymástól független kísérleten az alábbi általános képletek alkalmazásával a hibák összegződését feltételezve.

$$f = aA \pm bB, \quad \sigma_f^2 = a^2 \sigma_A^2 + b^2 \sigma_B^2 \pm 2ab \text{ cov}_{AB}$$

(A kovariancia tagot (cov_{AB}) a független adatok miatt nem vettem figyelembe.)

A biológiai variabilitásra kapott eredményeket az előző ábrán zöld színnel jelölve az látható, hogy a mérések 95%-ban a biológiai variabilitás 5% alatti, tehát kisebb jelentőségű, mint a technikai variabilitás.

Még szemléletesebben mutatja a technikai variabilitás domináns szerepét az alábbi ábra:



Eredményeink statisztikai értékelésével azt a következtetést lehet levonni, hogy a mi 2D elektroforézis kísérleteink körülményei mellett kétszeres (100 %) fehérjeexpresszió-különbség megfelelő detektálásához ($p < 0,05$ és a statisztikai próba ereje (power) $> 0,8$) a vizsgálati csoportoknak minimum 4 kísérleti állatból kell állniuk. Ha kisebb különbségeket (pl. 50%-os) is detektálni szeretnénk, az állatszámot legalább kilencre kellene növelni.

Ebben a témakörben végzett munkánkat a Journal of Proteomics folyóiratban (Vol. 74, 894-901, 2011) közzétettük és kizárólag 2D-elektroforézissel kapott kísérleti eredményeket tartalmaz, tömegspektrometriás fehérjeazonosítások nem történtek.

Ismételten megköszönöm Prof. Dr. Vékey Károlynak, hogy átnézte és elbírálta értekezésemet. Köszönöm elismerő szavait, megtisztelt, hogy munkámat szakmai szempontból kitűnőnek találta és javasolta számomra az MTA doktori fokozat odaítélését.

Szeged, 2013, április 15.



Dr. Janáky Tamás
a kémiai tudományok kandidátusa